

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ÜLDISE- JA MIKROOBIBIOKEEMIA ÕPPETOOL

Ragnar Sepp

***Serratia marcescens* kitinaasi ChiA kitiinile seostumise kineetika**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Juhendajad Silja Kuusk, PhD

Priit Väljamäe, PhD

Tartu 2016

## ***Serratia marcescens* kitinaasi ChiA kitiinile seostumise kineetika**

Kitiin on looduses rohkelt esinev biopolümeer, mis koosneb N-atsetüülglükoosamiini monomeeridest. Kitiini lagundavad looduses ensümaatiliselt kitinaasid, mida produtseerivad väga erinevad organismid. Kitinaaside uurimisel on saanud mudelorganismiks mullabakter *Serratia marcescens*. *S. marcescens* kitinolüütiline süsteem koosneb kahest eksokitinaasist – ChiA ja ChiB, endokitinaasist ChiC ja lüütilisest polüsahhariidi monooksügenaasist. Käesolevas töös on uuritud *S. marcescens* ChiA seostumist kitiinile eesmärgiga välja selgitada, kas kiirem on ensüümi assotsieerumine kitiini pinnale või kitiiniahela komplekseerumine ensüümi aktiivtsentrisse. Lisaks uuriti ensüümi katalüütilises tsentris paikneva aminohappe Trp<sup>167</sup> rolli seostumises ChiA mutandi ChiA W167A abil, kus Trp<sup>167</sup> on asendatudalaniiniga. Kahjuks ei saanud antud katseandmete põhjal määrata seostumise kiirust limiteerivat etappi, kuna kiire eksponendi relaksatsiooniaegu ei saanud leida, selleks on edasist uurimist vaja. Andmed näitavad, et Trp<sup>167</sup> ei oma olulist rolli assotsiatsioonil.

**Märksõnad:** *Serratia marcescens* ChiA, ChiA W167A,  $\alpha$ -kitiin, seostumiskineetika  
T390 Polümeeride tehnoloogia, biopolümeerid

### **The binding kinetics of *Serratia marcescens* ChiA to chitin**

Chitin is one of the most common biopolymers found in nature, it consists of N-acetylglycoseamid monomers. In nature chitin is degraded by enzymatic chitinases, which are produced by many different organisms. As a modelorganism, the soil bacterium *Serratia marcescens* is used in the chitinases studies. The *S. marcescens* chitinolytic system consists of two exo-chitinases – ChiA and ChiB, endo-chitinase ChiC and a lytic polysaccharide monooxygenase (CBP21). In this study we focus on the binding kinetics of *S. marcescens* ChiA to chitin The goal of this project is to determine, which is the faster step - the enzyme association to the chitin surface or the binding of a chitin chain to the enzymes active site is. Also, the importance of the catalytic site amino acid Trp<sup>167</sup> in the binding kinetics was studied. For this the ChiA mutant ChiA W167A, which has Trp<sup>167</sup> replaced with alanine, was used. Unfortunately, the rate limiting step of chitinase binding couldn't be determined due to the fact that the faster relaxation times couldn't be estimated with given data sets. Thus further surveys are needed. The results with the mutant ChiA W167A show, that Trp<sup>167</sup> does not have any importance in the association step of the catalytic cycle.

**Key words:** *Serratia marcescens* ChiA, ChiA W167A,  $\alpha$ -chitin, binding kinetics  
T390 Polymer technology, biopolymers

# SISUKORD

SISUKORD .....	3
KASUTATUD LÜHENDID .....	4
SISSEJUHATUS .....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 Kitiin .....	6
1.2 Kitinaasid .....	7
1.3 <i>Serratia marcescens</i> kitinolüütiline süsteem .....	9
1.3.1 ChiB .....	11
1.3.2 ChiC .....	12
1.3.3 CBP21 .....	12
1.3.4 ChiA .....	13
2 EKSPERIMENTAALOSA .....	18
2.1 Töö eesmärk .....	18
2.2 Materjalid .....	18
2.3 Metoodika .....	18
2.3.1 Ensüümide ChiA ja ChiA W167A MU-NAG <sub>2</sub> hüdrolyüsi kaliiber .....	18
2.3.2 Ensüümide ChiA ja ChiA W167A seostumiskatse .....	19
2.4 Tulemused ja arutelu .....	20
2.4.1 Seostumiskineetika teoreetiline analüüs .....	20
2.4.2 ChiA seostumine $\alpha$ -kitiinile .....	23
KOKKUVÕTE .....	29
SUMMARY .....	30
KIRJANDUSE LOETELU .....	31
LIHTLITSENTS .....	36

## KASUTATUD LÜHENDID

GH – glükosiid hüdrolaas

GlcNAc – N-atsetüül- $\beta$ -D-glükoosamiin

(GlcNAc)<sub>2</sub> – (N,N'-diatsetüül)kitobioos

ChiA – kitinaas A

ChiB – kitinaas B

ChiC – kitinaas C

LPMO – lüütiline polüsahhariidi monooksügenaas

FnIII – fibronektiin III

CBM – süsivesikut siduv moodul

CBP21 – kitiini siduv valk 21

wt – metsiktüüp (*wild type*)

mt – muteeritud (*mutant*)

MU – 4-metüül-umbelliferoon

MU-NAG<sub>2</sub> – MU-(GlcNAc)<sub>2</sub> – 4-metüülumbelliferüül  $\beta$ -D-N,N'-diatsetüülkitobiosiid

MU-(GlcNAc)<sub>3</sub> – 4-metüülumbelliferüül  $\beta$ -D-N,N',N''-triatsetüülkitotriosiid

(GlcNAc)<sub>4</sub> – tetra-N-atsetüülkitotetrosiid

NaAc – naatriumatsetaat

BSA – veise seerumi albumiin

ITC – isothermiline kalorimeetriline tiitrimine

HS-AFM – kiire aatomjõu mikroskoopia

CNW – happega töödeldud mikrokristalliline  $\alpha$ -kitiin

## SISSEJUHATUS

Kitiin on polüsahhariid, kovalentselt  $\beta$ -1,4-seotud N-atsetüül- $\beta$ -D-glükoosamiini (GlcNAc) jääkidest koosnev homopolümeer. Kitiini ahelad on enamasti pakitud kristallilistesse struktuuridesse. Sünteesikoguse ja leviku poolest looduses on kitiin teisel kohal, tselluloosi järel, igal aastal produtseeritakse ülemaailmselt umbes 100 miljardit tonni kitiin [Qin jt., 2002, Rinaudo, 2006]. Looduses esineb kitiin peamise komponendina seeneraku seinas, nematoodi munades ja artropoodide ehk lüljalgsete (putukate, koorikloomade) eksoskeletis [Tolaimate jt., 2000, Liu jt., 2006].

Nii keemiliste kui ka bioloogiliste mõjutuste suhtes on kitiin väga vastupidav. Keemiliselt saab kitiini lagundada kontsentreeritud hapete ning alustega.

Vaatamata suurele produktsioonile ei ole kitiin looduses akumulunud, seda tänu efektiivsele ensüüm-hüdrolüüsile. Sellistes protsessides osalevad ensüümid on küllaltki huvipakkuvad, sest tõrksate polüsahhariidide ensümaatilise konversioon on nii suure bioloogilise kui ka majandusliku tähtsusega [Horn jt., 2006].

Looduses katalüüsivad kitiinis esinevate  $\beta$ -1,4-glükosiidsidemete hüdrolüüsi kitinaasid glükosiid hüdrolaasi (GH) perekonnast 18 ja  $\beta$ -N-atsetüül-D-heksoaminidaas ehk kitobiaas. Kitinaasid lõikavad polümeerse kitiini lühemateks (GlcNAc)<sub>2</sub> disahhariidideks ehk kitobioosideks, seejärel kitobiaas hüdrolüüsib need GlcNAc monosahhariidideks [Dahiya jt., 2006]. *Serratia marcescens*'i kitinolüütiline süsteem on üks paremini uuritud kitinolüütiliste ensüümide süsteemidest. See koosneb neljast kitiini hüdrolüüsivast ensüümist: ChiC on endotallitlev mitteprotsessiivne kitinaas; ChiA ja ChiB on kaks protsessiivset kitinaasi, mis liiguvad kitiini ahelatel üksteise suhtes vastassuunaliselt [Horn jt., 2005]; ja kitiini siduvast valgust CBP21, mis on CBM33-tüüpi lüütiline polüsahhariidi monooksügenaas (LPMO). Viimane teeb katkeid kitiini ahelal oksüdatiivse katalüüsiga [Vaaje-Kolstad jt., 2010, Horn jt., 2012].

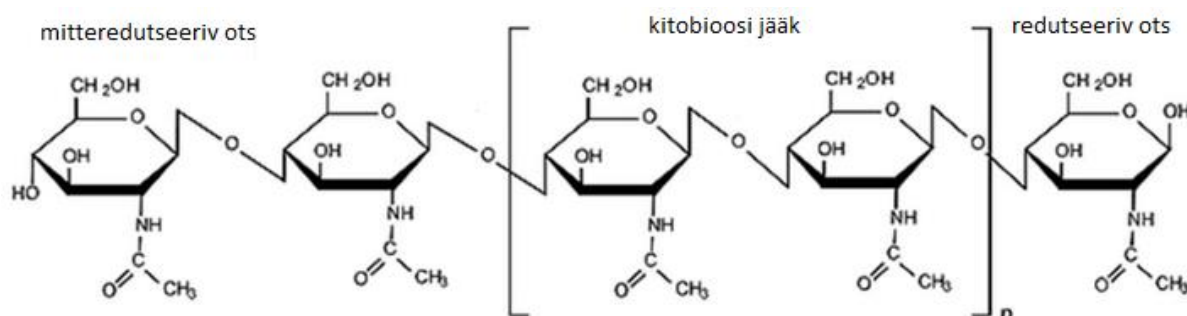
Tulenevalt kitiini kristallilisest struktuurist on enne katalüüsi toimumist vajalik kitinaasi seostumine kitiini pinnale. Esmasele seostumisele järgneb kitiini ahela komplekseerumine ensüümi aktiivtsentrisse ja ahela protsessiivne hüdrolüüs. Milline seostumisetapp, kas esmane seostumine või hilisem komplekseerumine, on seostumise jaoks kiirust piiravaks ei ole paraku teada.

Oma töö eksperimentaalses osas keskendun *S. marcescens* ChiA seostumiskineetika uurimisele.

## 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1.1 Kitiin

Kitiin on lineaarne vees lahustumatu polümeer, mille monomeeriks on glükoosi derivaat – N-atsetüül- $\beta$ -D-glükoosamiin (GlcNAc), mis on seotud polümeeriks anomeeri  $\beta$  konfiguratsioonis 1' ja 4' O vaheliste glükosiidsidemete abil. Selline glükosiidside, hapniku sild kahe suhkrujäägi vahel on tekkinud kondensatsioonireaktsiooni tulemusena. Polümeeriahelad seostuvad omavahel läbi vesiniksidemete ja Van der Waals interaktsioonide, moodustades kristallilise struktuuri. Kitiini struktuur ei koosne ainult kristallilistest piirkondadest, vaid esineb ka amorfseid piirkondi. Kitiini ahelad on suunalised – ahela redutseerivas otsas paikneb glükosiidsest sidemest vaba C1 hüdroksüülrühm ja mitteredutseerivas otsas vaba C4 hüdroksüülrühm.



**Joonis 1.** Kitiini ahel, korduv ühik N,N'-diatsetüülkitobioos, mis koosneb kahest  $\beta$ -1,4-glükosiidsidemetega ühendatud N-atsetüül- $\beta$ -D-glükoosamiinist. Iga monosahhariidi konformatsioon järgneva suhtes on  $180^\circ$  nurga all.

Vastavalt kitiini ahelate paigutusele eristatakse kolme erinevat kitiini tüüpi:  $\alpha$ -kitiini,  $\beta$ -kitiini ja  $\gamma$ -kitiini.  $\alpha$ -kitiini korral on polümeeriahelad üksteise suhtes antiparalleelsed (koorikloomade kitiin),  $\beta$ -kitiini polümeeriahelad on üksteise suhtes paralleelsed (peajalgseid, näiteks kalmaari kitiin) ning  $\gamma$ -kitiini polümeeriahelad vahelduvad kahe paralleelse ahela ja ühe antiparalleelse ahelaga (seente kitiin) [Tharanathan ja Kittur, 2003].

Kitosaan on kitiini osaliselt deatsetüleeritud derivaat, lineaarne lahustuv katioonne amino polüsahhariid,  $\beta$ -1,4-seotud D-glükoosamiini ja N-atsetüül-D-glükoosamiini jääkidest koosnev heteropolümeer. Kitosaan on ainuke leelis-kationiseeritud looduslik polüsahhariid ning tal on palju erilisi omadusi: bioühildav, biolagunev, mitte-toksiline ja -immunogeenne,

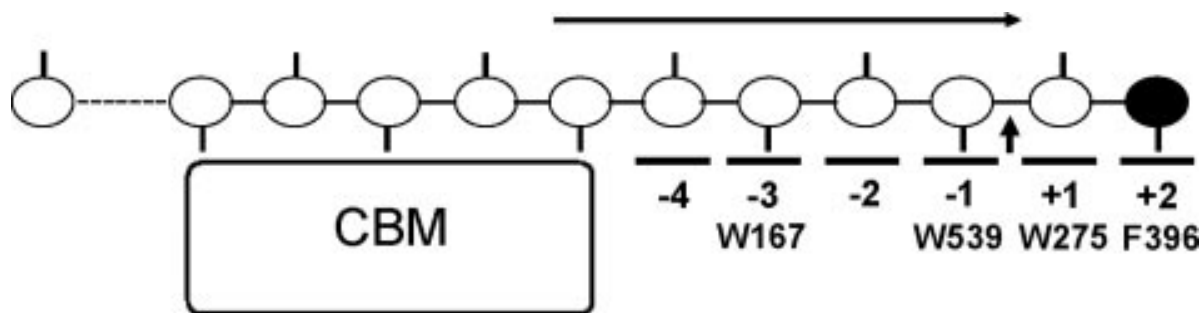
antibakteriaalne aktiivsus. Tänu kitosaani erilistele omadustele kasutatakse teda biotehnoloogias, biomeditsiinis (näiteks biolagunevad niidid), kosmeetikas, ravimite arendusel, põllumajanduses ning toiduteaduses [Li jt., 1992, Remunan-Lopez ja Bodmeier, 1997, Okamoto jt., 2002, Cheng jt., 2003, Chung jt., 2003].

## 1.2 Kitinaasid

Kitinaasid on kitinolüütilised ensüümid, glükosiid-hüdrolaasid, mis katalüüsivad kitiinis esinevate  $\beta$ -1,4-glükosiidsidemete hüdrolüüsi, lagundades vees lahustumatu kitiini madala molekulmassiga vees lahustuvateks  $(\text{GlcNAc})_2$  disahhariidideks ehk kitobioosideks. Viimased lagundatakse kitobiaasi poolt katalüüsitud hüdrolüüsis GlcNAc monosahhariidideks. Erinevad organismid produtseerivad kitinaase erinevatel põhjustel, lähtuvalt organismide enda füsioloogiast ja kitiini lagundamise otstarbest [Bhattacharya, Nagpure ja Gupta, 2007].

Kitinaasid kuuluvad GH18 perekonda, nad erinevad üksteisest kitiini lagundamise efektiivsuse ja aktiivtsentri seostumiskohtade ülesehituse poolest [Horn jt., 2006]. Neid ensüüme eristatakse põhiliselt seostumise, protsessiivsuse ning struktuuri järgi. Enamus kitinaase on multimodulaarsed ensüümid, mis koosnevad katalüütilisest domäänist ja seostumisdomäänist. Kitinaasi aktiivtsenter on vaokujuline ning võrdlemisi pikk ja sügav, mis on iseloomulik protsessiivsetele ensüümidele. Kuna multimodulaarsete kitinaaside katalüütilise domääni seostumiskohad ja substraadi seostumisdomään on omavahel jäigalt ühenduses, sõltub viimase asukohast ensüümi suunalisus [Van Aalten jt., 2000, Hult jt., 2005].

Perekonna GH18 kitinaaside katalüütilise domääni iseärasuste tõttu toimub kitiini hüdrolüüs substraat-abistatud mehhanismi abil (vt. joon. 2), mis eeldab substraadi N-atsetüül rühma olemasolu ja seostumist aktiivtsentri -1 seostumiskohas. Tänu sellele säilib anomeerne konfiguratsioon [Van Scheltinga jt., 1995, Van Aalten jt., 2001, Synstad jt., 2004]. Sellest lähtuvalt on GH18 kitinaasidel väga suur tähtsus N-atsetüülglükoosamiini seostumisel -1 seostumiskohta, samas on näidatud, et selline seostumine teistele seostumiskohtadele ei avalda niivõrd suurt mõju kitiini hüdrolüüsile [Honda jt., 2000, Sørbotten jt., 2005].



**Joonis 2.** Skemaatiline joonis *Serratia marcescens* kitinaas A (ChiA) aktiivtsentrist, millele on produktiivselt komplekseerunud kitiini ahel. Pulgad glükoosijääkidel näitavad N-atsetüül rühma asetsust, substraat-abistatud hüdrolyüsi toimumiseks on vajalik N-atsetüül rühma interaktsioon -1 seostumiskoha aromaatses aminohappejäägi kõrvalahelaga. Joonis on pärit artiklist Zakariassen jt., 2009.

Kitinaase on leitud väga erinevatest organismides. Nii neist, mis ise sisaldavad kitiini (näiteks putukad, seened, pärmid, peajalgseid) kui ka neist, mis ise kitiini ei sisalda (näiteks bakterid, taimed, selgroogsed) [Danişmazoğlu jt., 2015]. Nii kitiini kui ka tselluloosi lagundavad looduses põhiliselt bakterid ja seened, mis sekreteerivad hüdrolyütiliste ja oksüdatiivsete ensüümide kogumikke [Vaaje-Kolstad jt., 2013]. Paljude bakterite perekonnad – *Serratia* [Watanabe jt., 1997, Suzuki jt., 2002], *Aeromonas* [Weisburg jt., 1991, Wu jt., 2001, Synstad jt., 2008, Gökce jt., 2010] ja *Enterobakter* [Chernin jt., 1995] produtseerivad suurel hulgal kitinolüütilisi ensüüme [Nawani ja Kapadnis, 2001]. Väiksemal määral produtseerivad kitinaase veel mõned teatud mikroorganismid (näiteks *Bacillus thuringiensis*) [Danişmazoğlu jt., 2015]. Oma töös kasutasin *Serratia marcescens* ChiA, seetõttu keskendun järgnevalt *S. marcescens* kitinolüütilisele süsteemile.

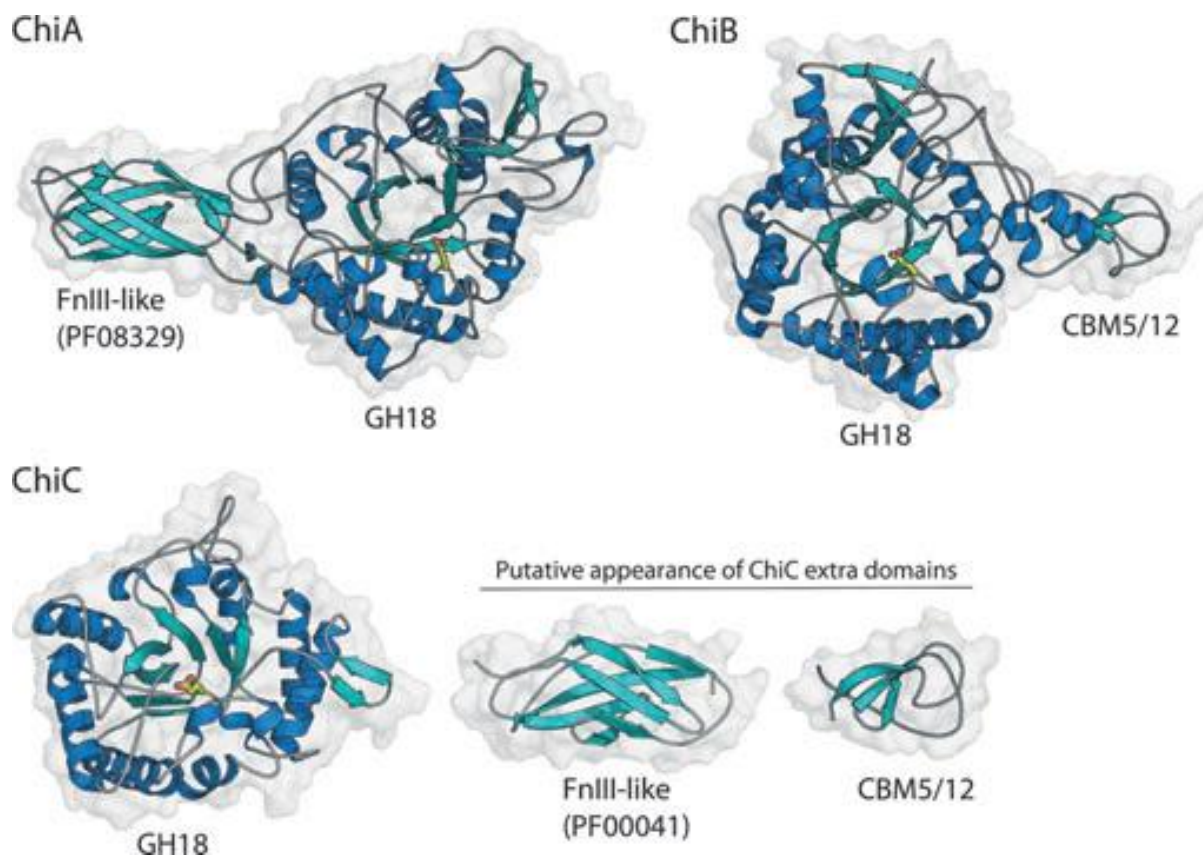


### 1.3 *Serratia marcescens* kitinolüütiline süsteem

Kitinaaside uuringutes kasutatakse mudelsüsteemina *Serratia marcescens*'i kitinolüütiliste ensüümide süsteemi. Arvatakse, et *S. marcescens* on seni uuritustest kõige efektiivsem kitiini lagundav mikroorganism [Vaaje-Kolstad jt., 2013]. *S. marcescens* on enterobakterite hulka kuuluv mullabakter, pulgakujuline gram-negatiivne fakultatiivne anaeroob. Geneetiliste uuringute abil on täpselt identifitseeritud erinevatelt *S. marcescens* tüvedelt pärit kitinaasid: kitinaas A (ChiA), kitinaas B (ChiB) ja kitinaas C1 (ChiC1). Samuti kuuluvad siia süsteemi ChiC1 proteolüütiline derivaat ChiC2, CBP21 ning kitobiaas [Suzuki jt., 2002]. *S. marcescens* kitinolüütilises süsteemi kitinaasid omavad sünergistlikku efektiivsust, igal kitinaasil on oma roll kitiini lagundamisel [Horn jt., 2006].

Esimene GH18 perekonna kitinaasi struktuur, mis tehti kindlaks oli *Serratia marcescens* ChiA [Perrakis jt., 1994], esimene CBM33 perekonna kitiini siduva proteiini struktuur oli *S. marcescens* CBP21 [Vaaje-Kolstad jt., 2004] ning esimene GH20 kitobiaasi struktuur oli *S. marcescens*  $\beta$ -N-atsetüül-D-heksoaminidaas [Tews jt., 1996], mis on ühtlasi tema ainuke kitobiaas.

*S. marcescens* GH18 perekonda kuuluvad kitinaasid on: endo-talitlev mitteprotsessiivne kitinaas C (ChiC), ekso-talitlevad protsessiivsed kitinaasid A (ChiA) ja B (ChiB). Viimased alustavad kitiini ahela lagundamist erinevalt, vastavalt redutseerivast ja mitteredutseerivast otsast, ja seega liiguvad ahelal üksteise suhtes vastassuunalised [Van Aalten jt., 2000, Hult jt., 2005].



**Joonis 3.** *S. marcescens*'i GH18 kitinaaside kristallilise struktuuri ülevaade. Välja on toodud ChiA ja ChiB multimodulaarsus ja ChiC homologide FnIII ja CBM5/12 domääni tuumamagnetresonants struktuur. Joonisel tähistab GH18 katalüütilist domääni ning FnIII-like ja CBM5/12 seostumisdomääni Joonis on pärit artiklist Vaaje-Kolstad jt., 2013.

### 1.3.1 ChiB

Kitinaas B seostub eelistatult substraadi ehk kitiini ahela otsaga, aga on ka endo seostumist kirjeldatud [Perrakis jt., 1994, Brurberg jt., 1996, Aronson jt., 2003]. See on protsessiivne ensüüm, mis tähendab, et peale hüdroolüüsi liigub ta mööda ahelat edasi. Ta lagundab kitiini ahelat mitteredutseerivast otsast ja liigub redutseeriva otsa suunas. ChiB koosneb kahest domäänist – katalüütilisest domäänist ja substraati siduvast domäänist (CBM), mis on omavahel jäigalt ühendatud. Kitinaas B CBM asub C-terminaalses otsas (vt. joon. 3) ja kuulub CBM5 klassi [Van Aalten jt., 2000].

*S. marcescens* ChiB ensüümi aktiivtsentris on 6 N-atsetüülglükoosamiini seondumiskohta, järjekorras -3 kuni +3. ChiB-d iseloomustab vaokujulise aktiivtsentri suhteliselt „kinnine“ ülemine osa [Van Aalten jt., 2001], mis annab aktiivtsentrile tunneli-laadse kuju [Davies ja Henrissat, 1995]. Kitiini ahel siseneb ChiB aktiivtsentrisse + seostumiskohast ja liigub - seostumiskoha suunas. Pärast substraadi hüdroolüüsi vabanevad dimeerid aktiivtsentri -1 ja -2 seostumiskohtades [Van Aalten jt., 2001].

ChiB aktiivsust 4-metüülumbelliferüül  $\beta$ -D-N,N'-diatsetüülkitobiosiidi (MU-NAG<sub>2</sub>) suhtes on näidatud  $K_m$  väärtusega  $31 \pm 6 \mu\text{M}$  ja  $k_{cat}$  väärtusega  $18 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ . 4-metüülumbelliferüül  $\beta$ -D-N,N',N''-triatsetüülkitotriosiid (MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>) substraadil on saadud ChiB  $K_m$  väärtuseks  $6.8 \pm 1 \mu\text{M}$  ja  $k_{cat}$  väärtuseks  $57 \pm 4 \text{ s}^{-1}$  [Horn jt., 2005].

### 1.3.2 ChiC

Kitinaasi C iseloomustab endo-laadne seostumine, see tähendab, et ta seostub eelistatult substraadi ehk kitiini ahela keskele. See on mitteprotsessiivne ensüüm, mis tähendab, et peale hüdrolyüsi vabaneb ta ahelalt ning peab uuesti substraadiga seostuma. ChiC koosneb katalüütilisest domäänist ja kahest substraati siduvast domäänist – FnIII moodulist ja temaga seotud CBM12 moodulist (vt. joon. 3). [Suzuki jt., 1999].

Täispikka kitinaasi C proteolüüsivad endogeensed proteaasid, mille tulemusel saadakse pikk (ChiC1) ning lühike variant (ChiC2), mis sisaldab ainult katalüütilist domääni.

ChiC puhul on ainult katalüütilise domääni kristalliline struktuur kindlaks määratud. ChiC vaokujuline aktiivtsenter on madala ja avatud struktuuriga, mis võimaldab endo-laadset seostumist [Van Scheltinga jt., 1994].

Lähtudes ChiC seostumisest kitiini ahelale endo-laadselt ja juhuslikult, on tema hüdrolyüsi produktideks uute ahela otsadega pikad kitiini fragmendid, mis on substraadiks ekso-laadsetele kitinaasidele (näiteks ChiA ja ChiB) [Horn jt., 2006].

Katses MU-(GlcNAc)<sub>3</sub>-ga on saadud ChiC  $K_m$  väärtuseks  $80 \pm 8 \mu\text{M}$  ja  $k_{cat}$  väärtuseks  $2.0 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ . ChiC näib omavat väiksemat katalüütilist efektiivsust lühemate substraatide peal kui ChiA ja ChiB [Horn jt., 2005].

### 1.3.3 CBP21

CBP21 on CBM33-tüüpi lüütiline polüsahhariidi monooksügenaas (LPMO), mis teeb kitiini ahelal katkeid oksüdatiivse katalüüsiga. [Vaaje-Kolstad jt., 2010, Horn jt., 2012]. Arvatakse, et CBP21 tegutseb substraadi piirkondadel, mis on kitinaasidele vähem juurdepääsetavad [Vaaje-Kolstad jt., 2013]. Lõhkudes kitiini ahelat, tekitab CBP21 uusi seostumiskohti kitinaasidele ja seega omab olulist sünergilist rolli *S.marcescens*'i kitinolüütilises süsteemis [Vaaje-Kolstad jt., 2005].

### 1.3.4 ChiA

ChiA on protsessiivne ensüüm, mis tähendab, et peale hüdroolüüsi liigub ta mööda ahelat edasi. Ta koosneb eraldiseisvast CBM ja katalüütilisest domäänist, mis on omavahel jäigalt ühendatud (vt. joon. 4A) [Zakariassen jt., 2009]. ChiA, vastupidiselt ChiB-le, alustab kitiini ahela lagundamist redutseerivast otsast liikudes mitteredutseeriva otsa suunas [Perrakis jt., 1994, Van Aalten jt., 2000].

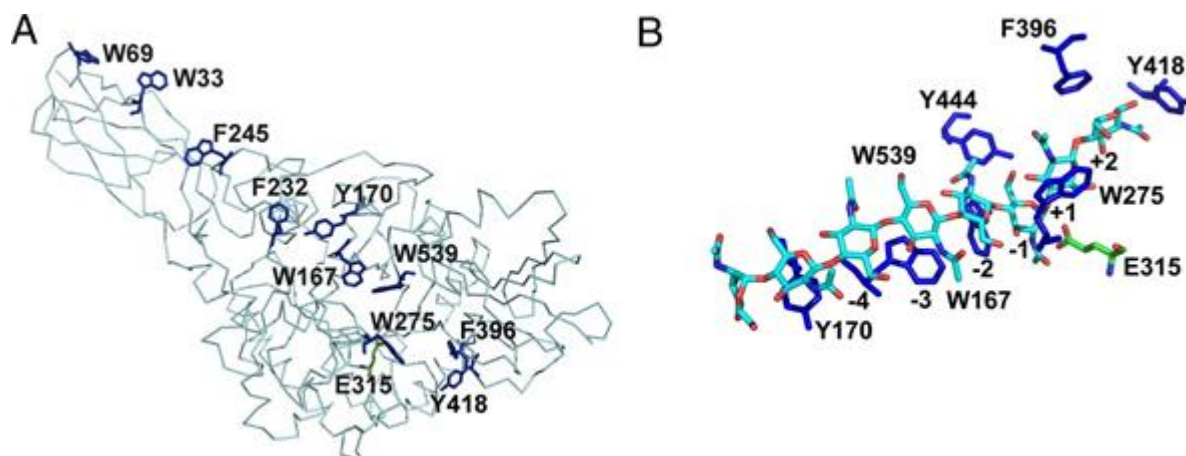
Algselt vaadeldi kitinaasi A kui kitiini ahela redutseeriva otsa spetsiifilist ekso-ensüümi, hiljem on näidatud ka endo-aktiivsust [Horn jt., 2006]. ChiA vaokujuline aktiivtsenter on sügava, kuid avatud struktuuriga, mis vihjab ka endo-laadse aktiivsuse olemaolule [Perrakis jt., 1994, Brurberg jt., 1996, Aronson jt., 2003]. Teatud tingimustes on ChiA endo-laadset aktiivsust kitosaaniga tehtud katsetes tõestatud [Sørbotten jt., 2005], samas tema sügav vaokujuline aktiivtsenter takistab ensüümi endo-laadset seostumist raskesti ligipääsetavatele substraatidele, milleks on tõeliselt lahustumatu ja kristalliline aine – kitiin [Perrakis jt., 1994].

#### 1.3.4.1 Katalüütiline tsenter

*S. marcescens* ChiA ensüümi katalüütilises tsentris on 6 glükoosijäägi seondumiskohta, järjekorras -4 kuni +2 (vt. joon. 4B). Kitiini ahel siseneb ChiA aktiivtsentrisse – seostumiskohast ja liigub + seostumiskoha suunas. Igale katalüütilise tsentri glükoosijäägi seondumiskohale vastab aromaatses aminohappejäägi kõrvalahel, seondudes korrektselt (vt. joon. 2), tekivad katalüüsiks vajalikud hüdrofoobsed interaktsioonid. Kitiini ahela hüdroolüüs jääb -1 ja +1 seostumiskohtade vahele, mida viib läbi katalüütiliselt aktiivse aminohappejäägi – glutamiinhappe (Glu<sup>315</sup>) kõrvalahel (vt. joon. 4B rohelisega märgitud E315). Pärast substraadi hüdroolüüsi vabanevad dimeerid aktiivtsentri +1 ja +2 seostumiskohtadest [Perrakis jt., 1994, Zakariassen jt., 2009]. -1 seostumiskohaga peab olema seotud N-atsetüül rühm, kui seda ei ole (näiteks kitosaani korral), siis hüdroolüüsi selle glükoosiühiku juures ei toimu (s.o mitteproduktiivne seostumine) ning ahel liigub edasi ja seejärel produtseeritakse pikem (paaris arvuline) oligomeer [Horn jt., 2006, Sikorski jt., 2006].

β-kitiini ja kitosaaniga tehtud katsete ChiA ja ChiA mutantidega (W167A, W275A ja F396A) põhjal näidati, et katalüütilise tsentri läheduses asuvatel aromaatsedel aminohappejääkidel on oluline mõju polümeeriahela korrektsel seondumisel vaokujulise aktiivtsentriga ning edasisel

protsessiivsusel. Seega protsessivne omadus võimaldab hea kitinolüütilise efektiivsuse kristallilisel substraadil, kuid limiteerib ChiA potentsiaalset kitinolüütilist kiirust, mida on näidatud amorfsetel substraatidel [Zakariassen jt., 2009].



**Joonis 4.** *S. marcescens* ChiA aromaatsete aminohappe jääkide asetus ja ensüüm-substraat interaktsioonid.

A:  $\alpha$ -süsinik ahel ning aromaatsed kõrvalahelad, mis joondavad katalüütilise domääni vaokujulise aktiivtsentri ja substraadi seostumis domääni pinnale.

B: ChiA aktiivtsenter. Aromaatsed aminohapped on mõlemal pildil märgitud tumesinisega, GlcNAc oligomeerid on märgitud helesinisega. Number tähistab glükoosijäägi-seostumiskohta. Joonis on modifitseeritud kujul pärit artiklist Zakariassen jt., 2009.

On leitud, et ChiA katalüütilise tsentri substraadi seostumiskohad jätkuvad CBM-ni [Uchiyama jt., 2010], kokku 13 substraadi seostumiskohta [Aronson jt., 2003]. Protsessiivsetel ekso-tsellulaasidel on leitud, et aktiivtsentril on seostumisenergia gradient, mis tagab suunalise kulgemise mööda ahelat [Payne jt., 2013]. Seega võib eeldada, et ChiA aminohappejäägid, mis jäävad väljapoole katalüütilist tsentrit, omavad mõju aktiivtsentri seostumisenergia gradiendi tekkimisele. Viimane soodustab produktiivset komplekseerumist, mis omakorda tagab protsessiivsuse [Payne jt., 2013, Knott jt., 2014, Golussi jt., 2015].

#### 1.3.4.2 Kitiinile seostumise domään

Kitinaas A CBM asub N-terminaalses otsas, ta kuulub fibronektiin III (FnIII) tüüpi CBM-de hulka (vt. joon. 3) [Van Aalten jt., 2000]. See eraldiseisev domään vastutab kitinaasi algse seostumise ja kitiini ahela otsaga komplekseerumise eest, milleks ChiA puhul on polümeeriahela redutseeriv ots [Hult jt., 2005]. Struktuurset paikneb ChiA CBM domään võrrelduna ChiB CBM domääniga vastastikusel poolel. Kuid sellest ainuüksi ei tulene nende ekso-kitinaaside omadus hüdroolüüsida kitiini ahelat vastupidises suunas, olulist rolli omab siinjuures katalüütilise tsentri läheduses olevate aromaatsete aminohapete kõrvalahelate paiknemine [Zakariassen jt., 2009].

#### 1.3.4.3 Biokeemiline iseloomustus

Tõrksate polüsahhariidide ekso-laadsete protsessiivsete ensüümide hüdroolüüsi protsessi kirjeldatakse nelja järjestikuse etapina: polümeeri pinnale seostumine; polümeeriahela otsa äratundmine ning sellega seostumine; produktiivse ensüüm-substraat kompleksi moodustumine ja polümeeriahela protsessiivne hüdroolüüs; ahela pinnalt dissotsieerumine [Beckham jt., 2014]. Ensüümikineetika uurimine on vajalik mõistmaks, milline on hüdroolüüsi limiteeriv etapp või pidurdav tegur.

Isotermilise kalorimeetrilise tiitrimise (ITC) katsed viitavad, et kiirust piirav etapp ei ole produkt-inhibitsioon ja võiks olla komplekseerumine. ITC meetodil on määratud ChiA seostumise  $K_d$  väärtuseks MU-NAG<sub>2</sub>-ga  $0,40 \pm 0,1$  mM [Kuusk jt., 2015].  $\beta$ -kitiiniga tehtud ChiA aktivatsiooni parameetrite mõõtmised on näidanud, et ChiA poolt katalüüsitud hüdroolüüs omab suurt entroopilist aktivatsioonibarjääri. Suur entroopiline aktivatsioonibarjäär iseloomustab bimolekulaarset kiirust määravat etappi, mis viitab sellele, et  $\beta$ -kitiini hüdroolüüsi kiirust limiteerib komplekseerumine kitiini ahelaga [Zakariassen jt., 2010].

Kitiini nanovurrudega (happega töödeldud mikrokristalliline  $\alpha$ -kitiin, CNW) läbiviidud algkiiruse baasil arvatud oletatavaks ChiA  $k_{cat}$  väärtuseks on saadud  $105 \pm 10$  s<sup>-1</sup> [Kuusk jt., 2015]. Kristallilist  $\beta$ -kitiini kasutades saadi algkiiruse baasil arvatud ChiA  $k_{cat}$  väärtuseks  $0,54 \pm 0,04$  s<sup>-1</sup> (katse viidi läbi 37 °C juures erinevalt eelnevalt mainitud katsetest, mis viidi läbi 25 °C juures) [Zakariassen jt., 2010]. Märgatavat erinevust  $k_{cat}$  väärtuste vahel saab seletada ChiA parema ligipääsuga CNW-le kui  $\beta$ -kitiinile. On leitud ka ChiA  $k_{cat}$  väärtus

osaliselt atsetüleeritud kitosaaniga tehtud katsetes, mis jääb vahemikku  $20 - 40 \text{ s}^{-1}$  [Zakariassen jt., 2010]. ChiA vaadeldud  $k_{cat}$  väärtused langesid kiiresti hüdrolyüüsi kestel CNW-ga tehtud katsetes [Kuusk jt., 2015].

Hiljuti demonstreeriti kiire aatomjõu mikroskoopia (HS-AFM) meetodil ChiA ja ChiB protsessiivset omadust ja nende kitinolüütilist vastassuunalist liikumist. HS-AFM uuringus vaadeldi ChiA liikumist reaal-ajas mööda  $\beta$ -kitiini mikrofibrille ning leiti läbitud vahemaad teatud ajahetkedel. Nende andmete edasisel analüüsimisel saadi ChiA protsessiivse liikumise poolestusajaks ( $\tau$ )  $0,293 \pm 0,036 \text{ s}$  ja keskmiseks kiiruseks  $70,5 \pm 25,2 \text{ nm s}^{-1}$ , nende väärtuste põhjal arvutati ChiA arvestuslikuks protsessiivsuse poolestusajaks 21 reaktsiooni ( $\beta$ -kitiini korduvühiku ehk kitobioosi pikkus on 1 nm) [Igarashi jt., 2014].

#### 1.3.4.4 ChiA mutant W167A

ChiA detailseks uurimiseks on erinevates laborites tehtud palju erinevaid mutante. Muudatused aktiivtsentri aromaates aminohappejääkides võimaldavad aru saada nende olulisusest ensüümi protsessiivsusele ja efektiivsusele. Tehtud uuringud näitavad, et aromaatsed aminohappejäägid, mis neid omadusi drastiliselt mõjutavad, paiknevad katalüütilise tsentri lähedal [Horn jt., 2006, Zakariassen jt., 2010]. Oma töös kasutasin ChiA mutanti W167A, mis on tehtud Norras (Prof. M. Sørli, Norwegian University of Life Sciences).

ChiA W167A mutandi aktiivtsentris on -3 seostumiskohas trüptofaan (W167) (vt. joon. 4B) asendatudalaniiniga (A). ChiA Trp167 on väga oluline protsesiivsusele, W167A mutandiga tehtud katsetes, kasutades substraadina  $\beta$ -kitiini, näidati protsesiivsuse drastilist vähenemist. Katses leiti, et ChiA W167A mutant omas algkiirust,  $k_{cat}^{app} 0,54 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ , mis on 1,5 korda aeglasem ChiA algkiirusest,  $k_{cat}^{app} 0,54 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$  [Zakariassen jt., 2010].  $\beta$ -kitiini 50 h hüdrolyüüsi katse andis tulemuseks 30% wt ChiA saadust. Samas on näidatud ka ChiA W167A mutandil kuni 10x suuremat katalüütilist aktiivsust kitosaani suhtes [Zakariassen jt., 2009].

Tetra-N-atsetüülkitotetrosiid ( $\text{GlcNAc}$ )<sub>4</sub> substraadil saadi ChiA W167A  $k_{cat}$  väärtuseks  $97 \pm 9 \text{ s}^{-1}$  ja  $K_m$  väärtuseks  $333 \pm 44 \text{ }\mu\text{M}$ , võrdlusena wt ChiA samade katsetingimustega  $33 \pm 1 \text{ s}^{-1}$  ja  $9 \pm 1 \text{ }\mu\text{M}$ , vastavalt. Antud tulemused on huvitavad, kuna produktiivselt ( $\text{GlcNAc}$ )<sub>4</sub> ei seostu aktiivtsentri -3 seostumiskohaga, ainult -2 kuni +2, aga samas omab ChiA W167A ensüüm-



substraadi kompleks 37 korda väiksemat afiinsust, mis tähendab, et Trp<sup>167</sup> omab rolli substraadi jõudmisel vaokujulisse aktiivtsentrisse [Krokeide jt., 2007, Norberg jt., 2011].

Need tulemused näitavad, et protsessiivne mehhanism on kristallilise substraadi lagundamisel väga oluline, kuid pärsib ensüümi aktiivsust amorfset substraadil [Horn jt., 2006, Zakariassen jt., 2009]. Ühtlasi arvatakse W167A mutandiga tehtud katsete põhjal, et mittelahustuvate substraatide (kitiin) ja lahustuvate substraatide (kitosaan) hüdrolüüsi kiirust limiteerivad etapid on erinevad [Zakariassen jt., 2010]. Mutantsete ensüümide katsetega on jõutud arvamusele, et protsessiivsus nõuab tugevat produkti seostumist, seega ka tugevat produkt-inhibitsiooni [Bu jt., 2012]. Hiljuti näidati ChiA ja ChiA W167A erinevaid  $k_{off}$  väärtusi erinevatel substraatidel, näiteks ChiA  $k_{off}$  väärtusteks saadi CNW substraadil  $0,012 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$  ning  $\alpha$ -kitiinil  $0,0015 \pm 0,0005 \text{ s}^{-1}$ , tuues välja seose madala  $k_{off}$  väärtuse ja protsessiivsuse tugevuse vahel [Kurašin jt., 2015].

## 2 EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärk

Käesoleva töö eesmärgiks on välja selgitada, milline on kiirust piirav etapp *S. marcescens*'i kitinaasi ChiA seostumisel kitiiniga – kas ensüümi esmane assotsieerumine kitiini kristalli pinnale või hilisem kitiini ahela komplekseerumine ensüümi aktiivtsentriga.

### 2.2 Materjalid

Substraadid – Atsetüleeritud kristalliline  $\alpha$ -kitiin, valmistatud krabi kitiinist (Sigma 7170) Dr. Kuuse ja Dr. Väljamäe poolt (acUHa1) [Kuusk jt., 2015]; 4-metüül-umbelliferüül-diatsetüülkitobiosiid hüdraat (MU-NAG<sub>2</sub>), (Sigma M9763).

Ensüümid – *S. marcescens* kitinaas A (ChiA) ja selle mutant ChiA W167A on saadud uurimisgrupi Norra kolleegilt Dr. M. Sorlie'lt (Norwegian University of Life Sciences).

### 2.3 Metoodika

#### 2.3.1 Ensüümide ChiA ja ChiA W167A MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsi kaliiber

Ensüüme inkubeeriti 5  $\mu$ M MU-NAG<sub>2</sub> substraadiga 50 mM Na-atsetaat puhvis pH 6,1 0,1 g/l BSA juuresolekul 25 °C juures.

ChiA kontsentratsioonid olid 0,1 – 1 nM, ChiA W167A kontsentratsioonid olid 0,5 – 2 nM. Reaktsiooniajad olid ChiA puhul: 1 min, 2 min, 3 min, 5 min ja 10 minutit; ja ChiA W167A puhul: 10 min, 15 min, 20 min, 25 min ja 30 minutit. Reaktsioon peatati NaOH lisamisega lõppkontsentratsioonini 10 mM, ja seejärel viidi ruumala 1 ml-ni 0,1 M NH<sub>3</sub>-ga.

0 min ajapunkti puhul lisati reaktsioonisegule NaOH enne ensüümi lisamist.

Fluorestsentsi mõõdeti ergastuse ja emissiooni lainepikkustel vastavalt 360 nm ja 450 nm kasutades Hitachi F-4500 fluorimeetrit. Fluorestsentsi abil saab määrata vabanenud MU kontsentratsiooni, kasutades meie laboris määratud suhet 1 nM MU = 14 dINT.

### 2.3.2 Ensüümide ChiA ja ChiA W167A seostumiskatse

0,1 g/L; 0,2 g/L; 0,5 g/L; 1 g/L ja 2 g/L acUHa1 substraati inkubeeriti 1 nM ChiA või ChiA W167A ensüümiga 50 mM Na-atsetaat pH 6,1 puhvris 0,1 g/L BSA juuresolekul 25 °C juures pidevalt segades. Soovitud aja järel võeti välja 0,5 ml alikvoodid ja reaktsioon peatati filtreerimisega läbi GF-D Whatman filtri.

Filtraati tsentrifuugiti 2 minutit  $10000 \times g$  juures ning eraldati supernatant.

Null ajapunkti saamiseks eraldati enne reaktsiooni käivitamist 450 µL reaktsioonisegust, samuti tsentrifuugiti 2 minutit  $10000 \times g$  juures ning eraldati supernatant, järgnevalt tehti kõike samamoodi.

Vaba ensüümi määramiseks hüdrolüüsi supernatanti jäänud ensüümiga MU-NAG<sub>2</sub>-substraati. Selleks lisati 200 µL supernatandile 5 µM MU-NAG<sub>2</sub> substraati ja inkubeeriti 25 °C juures. ChiA korral oli katse kestvuseks 5 min ning ChiA W167A korral 30 min. Katseaja möödudes peatati reaktsioon lisades NaOH-d lõppkontsentratsiooniga 10 mM ja segati vortexil.

Peatatud reaktsioonisegu lahjendati 750 µL 0,1 M ammoniaagiga ja mõõdeti fluorestsents ergastuse ja emissiooni lainepikkustel vastavalt 360 nm ja 450 nm kasutades Hitachi F-4500 fluorimeetrit.

Fluorestsentsi mõõtmine näitab vabanenud 4-metüül-umbelliferooni (MU) suhtelist hulka. Kasutades MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsi kaliibri katses lineaarse regressiooni teel saadud kaliibreerimissirge tõusu saab välja arvutada reaktsioonis osaleva vaba ensüümi kontsentratsiooni ( $E_{vaba}$ ) ja seejärel seostunud ensüümi kontsentratsiooni ( $E_{seost}$ ). Seostunud ensüümi kontsentratsiooni saab leida kogu ensüümi kontsentratsiooni ( $E_{tot}$ ) ja vaba ensüümi kontsentratsiooni vahe kaudu ( $E_{seost} = E_{tot} - E_{vaba}$ ).

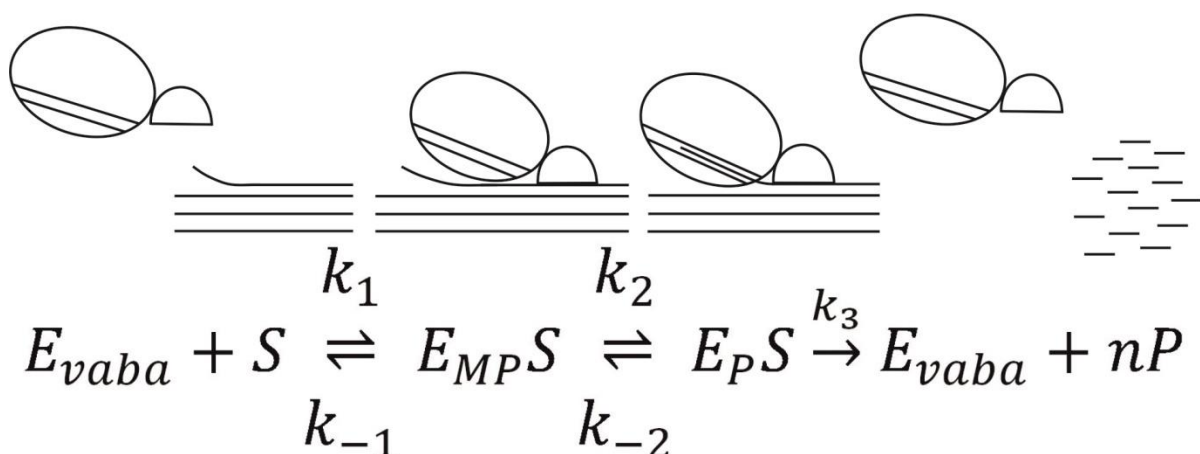
## 2.4 Tulemused ja arutelu

### 2.4.1 Seostumiskineetika teoreetiline analüüs

Lähtudes kitiini kristallilisest struktuurist on tema ensümaatiline hüdroolüüs vaadeldav tahkevedel piirpinnal toimuva heterogeense katalüüsina. On ilmne, et katalüüsi toimumiseks peab ensüüm eelnevalt seostuma kitiini pinnale. Kitinolüütilise ensüümikineetika mudel ensüümil *S. marcescens* ChiA-l on selleks eraldiseisev CBM domään.

CBM-i vahendatud seostumisele järgneb ensüümi liikumine mööda polümeeriahelat lateraalse difusiooni teel, et leida ahela redutseeriv ots. Redutseeriv ots suunatakse katalüütilise domääni aktiivtsentrisse samm-sammuliste protsesside abil, mille käigus kinnitub redutseeriv ots aktiivtsentri tunneli viimasesse seostumiskohta ning hüdroolüüs saab toimuda.

Mitteproduktiivne ensüüm-substraat kompleks ( $E_{MP}S$ ) on kompleks, kus ensüüm on mitteproduktiivselt seostunud substraadile, sinna alla kuuluvad: substraadi pinnale seostunud ensüüm ja ensüüm, mis on ahelaga komplekseerunud, aga mitte kaugemale kui aktiivtsentri -1 seostumiskoht. Algsele kitiini ahelale seostumisele läbi ChiA eraldiseisva CBM-i järgneb ensüümi liikumine mitte-redutseeriva otsa suunas, mis lõppeb, kui ahela redutseeriv ots asub ChiA aktiivtsentri +2 seostumiskohas (produkti seostumiskohas), moodustub produktiivne ensüüm-substraat kompleks ( $E_P S$ ) [Kuusk jt., 2015].



**Skeem 1.** Reaktsiooniskeem, ChiA vahendatud kitiini ensüümhüdroolüüs. Ensüümi (E) seostumine kitiinile (S) on kirjeldatud kaheastmelise reaktsiooniskeemi abil. Esimeses astmes vaba ensüüm ( $E_{vaba}$ ) seostub kitiini pinnale, mille tulemusena moodustub mitteproduktiivne ensüüm-substraat kompleks ( $E_{MP}S$ ), millele järgneb kitiini ahela komplekseerumine ensüümi aktiivtsentrisse ja moodustub produktiivne ensüüm-substraat kompleks ( $E_P S$ ). Teises astmes toimub katalüüs, mille tulemusena  $E_P S$  kompleks laguneb ensüümi dissotseerumisel ja

vabanevad  $E_{vaba}$  ja  $n$  produktimolekuli, kus  $n$  on ensüümi protsessiivsus.  $E_{MP}S$  ja  $E_P S$  kompleksid võivad pöördreaktsiooni teel laguneda, kiiruskonstantidega vastavalt  $k_{-1}$  ja  $k_{-2}$ .

Lähtuvalt reaktsiooniskeemist ja massitoimeseadusest on võimalik iga ensüümi vormi jaoks välja kirjutada seos, mis kirjeldab tema kontsentratsiooni muutumist ajas.

$$\frac{d[E_{vaba}](t)}{dt} = k_{-1}[E_{MP}S](t) + k_3[E_P S](t) - k_1 S_0[E_{vaba}](t), \quad (\text{võrrand 1})$$

$$\frac{d[E_{MP}S](t)}{dt} = k_1 S_0[E_{vaba}](t) + k_{-2}[E_P S](t) - k_{-1}[E_{MP}S](t) - k_2[E_{MP}S](t), \quad (\text{võrrand 2})$$

$$\frac{d[E_P S](t)}{dt} = k_2[E_{MP}S](t) - k_{-2}[E_P S](t) - k_3[E_P S](t). \quad (\text{võrrand 3})$$

Võrrandites 1 ja 2 on vaadeldud substraadi kontsentratsiooni ajast sõltumatusena ja tähistatud kogukontsentratsiooniga ( $S_0$ ).

Kehtib ka seos, mis ütleb, et kõikide ensüümi vormide kontsentratsioonide summa võrdub koguensüümi kontsentratsiooniga ( $E_0$ ) (võrrand 4).

$$E_0 = [E_{vaba}](t) + [E_{MP}S](t) + [E_P S](t). \quad (\text{võrrand 4})$$

Lähtudes võrranditest 1 kuni 4 tuletas Dr. P. Kuusk, (TÜFI teoreetilise füüsika labor), iga ensüümi vormi kontsentratsiooni ajasõltuvust kirjeldava seose. Vaba ensüümi kontsentratsiooni ajasõltuvust kirjeldav seos on järgmine:

$$[E_{vaba}](t) = M_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + M_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + (E_0 - M_1 - M_2). \quad (\text{võrrand 5})$$

$M_1$  on amplituudi näitaja ehk integreerimiskonstant, mis iseloomustab vaba ensüümi seostumise esimest etappi,  $M_2$  on integreerimiskonstant seostumise teise etapi jaoks ning  $\tau_1$  on relaksatsiooniaeg seostumise esimese etapi jaoks ja  $\tau_2$  on relaksatsiooniaeg seostumise teise etapi jaoks.

Kõikide ensüümi vormide kontsentratsiooni ajasõltuvus on oma üldkujult sarnane, koosnedes kahe eksponentfunktsiooni summast, millele lisandub ajast sõltumatu konstantne liige. Ajast sõltumatu konstantne liige võrdub vastava ensüümi vormi statsionaarse oleku kontsentratsiooniga. Vaba ensüümi kontsentratsioon statsionaarses olekus ( $[E_{vaba}]_{St}$ ) on kirjeldatud järgnevalt

$$[E_{vaba}]_{St} = E_0 - M_1 - M_2. \quad (\text{võrrand 6})$$

Võrrandis 5 esinevad relaksatsiooniajad ( $\tau_1$  ja  $\tau_2$ ) on seotud reaktsiooniskeemil (skeem 1) toodud kiiruskonstantidega vastavalt seostele

$$\frac{1}{\tau_1} = \frac{A}{2} - \sqrt{\frac{A^2}{4} - B}, \quad (\text{võrrand 7})$$

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{A}{2} + \sqrt{\frac{A^2}{4} - B}, \quad (\text{võrrand 8})$$

kus omakorda

$$A = k_1 S_0 + k_{-1} + k_2 + k_{-2} + k_3, \quad (\text{võrrand 9})$$

$$B = k_1 S_0 (k_2 + k_{-2} + k_3) + k_{-1} k_2 + k_{-1} k_3 + k_2 k_3. \quad (\text{võrrand 10})$$

Üksikute kiiruskonstantide väärtuste leidmisel katseliselt määratud relaksatsiooniaegadest on otstarbekas analüüsida mitte relaksatsiooniaegu eraldivõetuna, vaid nende pöördväärtuste summat ja korrutist.

$$\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2} = A, \quad (\text{võrrand 11})$$

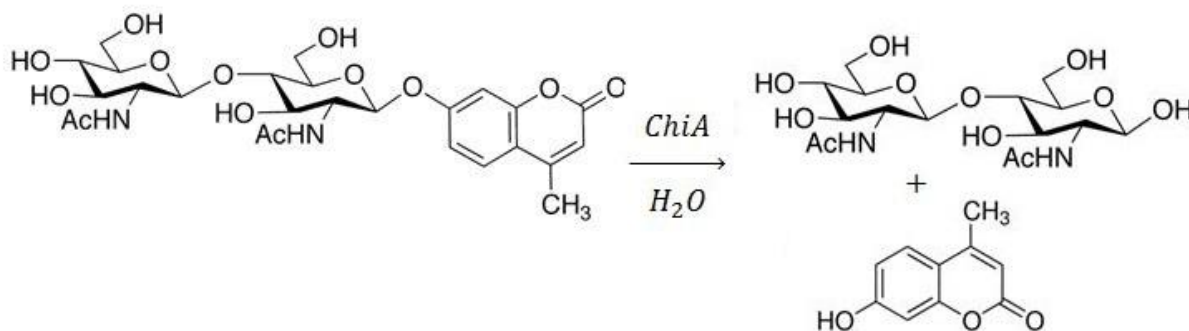
$$\frac{1}{\tau_1} \frac{1}{\tau_2} = B. \quad (\text{võrrand 12})$$

Mõõtes mõlema relaksatsiooniaja ( $\tau_1$  ja  $\tau_2$ ) väärtused erinevatel substraadi kontsentratsioonidel on graafikutel  $\frac{1}{\tau_1} + \frac{1}{\tau_2}$  versus  $S_0$  ja  $\frac{1}{\tau_1 \tau_2}$  versus  $S_0$  võimalik leida kõigi viie reaktsiooniskeemis (skeem 1) esineva kiiruskonstandi väärtused.

## 2.4.2 ChiA seostumine $\alpha$ -kitiinile

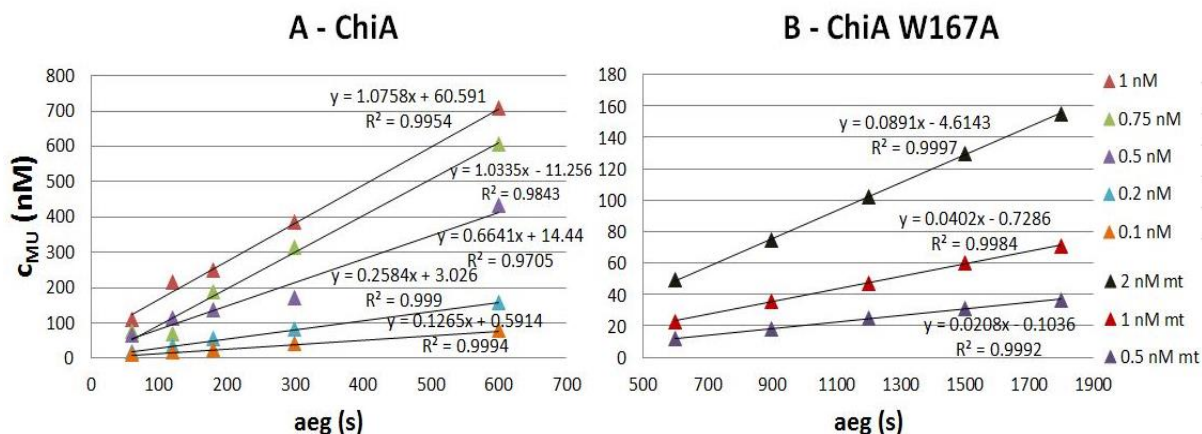
### 2.4.2.1 Vaba ensüümi kontsentratsiooni määramine MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsi kaudu

Vaba ensüümi määramiseks kasutati ensümaatilist meetodit, mille eeliseks on kõrge tundlikkus, sest reaktsiooni aega pikendades saab signaali võimendada. MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsiks peab seostumine toimuma -2 kuni +2 seostumiskohtades, mida avatud vaokujuline aktiivsenter võimaldab ka endo-laadse seostumisega. Hüdrolüüsil lõhutakse MU ja NAG<sub>2</sub> vaheline glükosiidside (vt. joon. 5), moodustub MU, mille fluorestsentsi saab mõõta. Et oleks võimalik määrata MU kontsentratsiooni kaudu vaba ensüümi kontsentratsiooni, tehti vastav kaliiber.



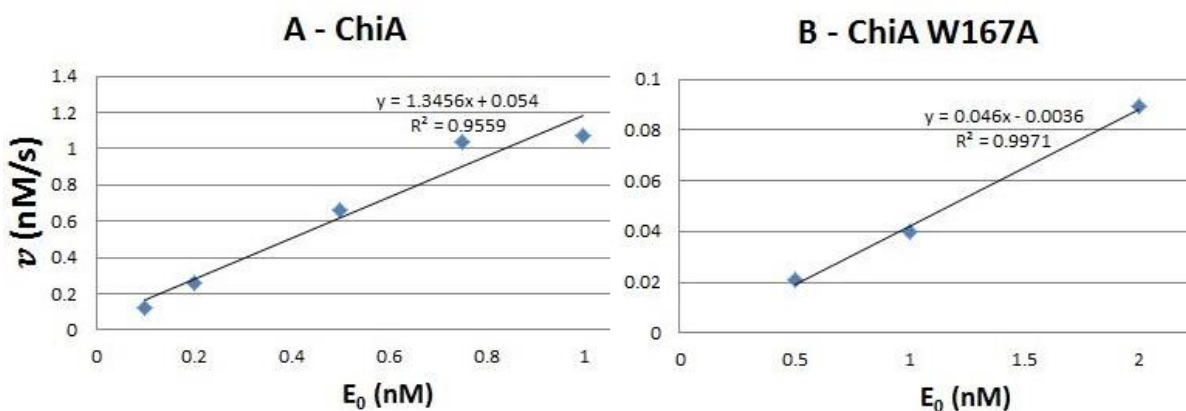
**Joonis 5.** MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüs, katalüüsitud ChiA poolt. Tulemuseks on NAG<sub>2</sub> ja MU, viimane fluorestseerub aluselises keskkonnas.

MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsi kaliibri tegemiseks määrati esmalt MU kontsentratsiooni ( $c_{\text{MU}}$ ) muutus ajas, hüdrolüüsides MU-NAG<sub>2</sub>-te erinevatel kitinaaside kontsentratsioonidel, MU-NAG<sub>2</sub> lõppkontsentratsioonil 5  $\mu\text{M}$  (vt. joon. 6). MU fluorestsentsi mõõdetakse ergastuse ja emissiooni lainepikkustel vastavalt 360 nm ja 450 nm. Seega saab fluorestsentsi abil määrata vabanenud MU kontsentratsiooni, kasutades meie laboris määratud suhet 1 nM MU = 14 dINT.



**Joonis 6:** Kitinaaside ChiA (A) ja ChiA W167A (B) MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsi ajakõverad. 5  $\mu\text{M}$  MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsiti erinevate ensüümi algkontsentratsioonide ( $E_0$ , nM) juures.

Kasutades MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsi ajakõverate lineaarset regressiooni on võimalik leida iga ensüümi kontsentratsiooni jaoks sirge võrrand. Antud juhul huvitab meid sirge tõus, mis  $c_{\text{MU}}$  vs aeg graafikul (vt. joon. 6) näitab reaktsiooni kiirust ( $v$ , nM/s), mis iseloomustab kindlat ensüümi kontsentratsiooni. Joonisel 7 on iga ensüümi kontsentratsiooni jaoks leitud sirge tõus (vastavalt joonisele 6), mis on viidud vastavusse kogu ensüümi kontsentratsioonidega ( $E_0$ , nM). Nende andmetega saadud graafikule leiti lineaarse regressiooni abil veel kord sirge võrrand (vt. joon. 7).



**Joonis 7:** Kitinaaside ChiA (A) ja ChiA W167A (B) MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsi reaktsioonide kiiruste ( $v$ , nM/s) vastavus ensüümi algkontsentratsioonidele ( $E_0$ , nM).

Joonisel 7 kujutatud sirge võrrandi tõusud iseloomustavad ChiA (vt. joon. 7A) ja ChiA W167A (vt. joon. 7B) aktiivsust kindlal MU-NAG<sub>2</sub> kontsentratsioonil ( $v/E_0$ ), väärtustega  $1,3456 \text{ s}^{-1}$  ja  $0,046 \text{ s}^{-1}$ , vastavalt. Nendes tulemustes on näha suurt erinevust ensüümi aktiivsustes, mis tuleneb ChiA W167A aktiivtsentri -3 seostumiskohas olevast mutatsioonist. See ei ole üllatav, kuna varasemates töödes on märgitud katalüütilises domäänis asuvate aromaatsete aminohappejääkide kõrvalahelate olulisust [Perrakis jt., 1994, Zakariassen jt.,



2009], seda ka olukorras, kus produktiivse ensüüm-substraadi kompleksi moodustumisel ei toimu -3 seostumiskohale seostumist [Norberg jt., 2011]. Trp<sup>167</sup> olulisust iseloomustavad hästi (GlcNAc)<sub>4</sub> substraadil leitud ChiA [Krokeide jt., 2007] ja ChiA W167A [Norberg jt., 2011]  $K_m$  väärtused, ChiA W167A 37 korda suurem  $K_m$  näitab nõrka interaktsiooni substraadi ja ensüümi -2 kuni +2 seostumiskohtade vahel.

MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolyüüsi aktiivsuse kaudu saab võrrandit 13 kasutades määrata vaba ensüümi kontsentratsiooni

$$E_{vaba} = \frac{v_{MU}}{\alpha}, \quad (\text{võrrand 13})$$

$\alpha$  on joonistel 7A ja 7B lineaarse regressiooni abil saadud sirge tõus.

### 2.4.2.2 Kitiinile seostumise kineetika

Kitinaasi algne seostumine kitiinile on kirjeldatav teist järku reaktsiooniga (vt. skeem 1). Kitinaasi lateraalsest difusioonist mööda kitiini ahelat ja viimase sammammuline edasimineki aktiivtsentri tunnelis on kirjeldatavad esimest järku reaktsiooniga [Kuusk jt., 2015]. Seostumiskineetika paremaks mõistmiseks teostati vaba ensüümi kontsentratsiooni ( $E_{vaba}$ ) ajasõltuvusel põhinev statistiline analüüs.

$E_{vaba}$  määrati erinevatel substraadi algkontsentratsioonidel. MU-NAG<sub>2</sub> hüdrolüüsi kaliibrist saadud katseandmete abil arvutati  $E_{vaba}$ , vastavalt võrrandile 13.

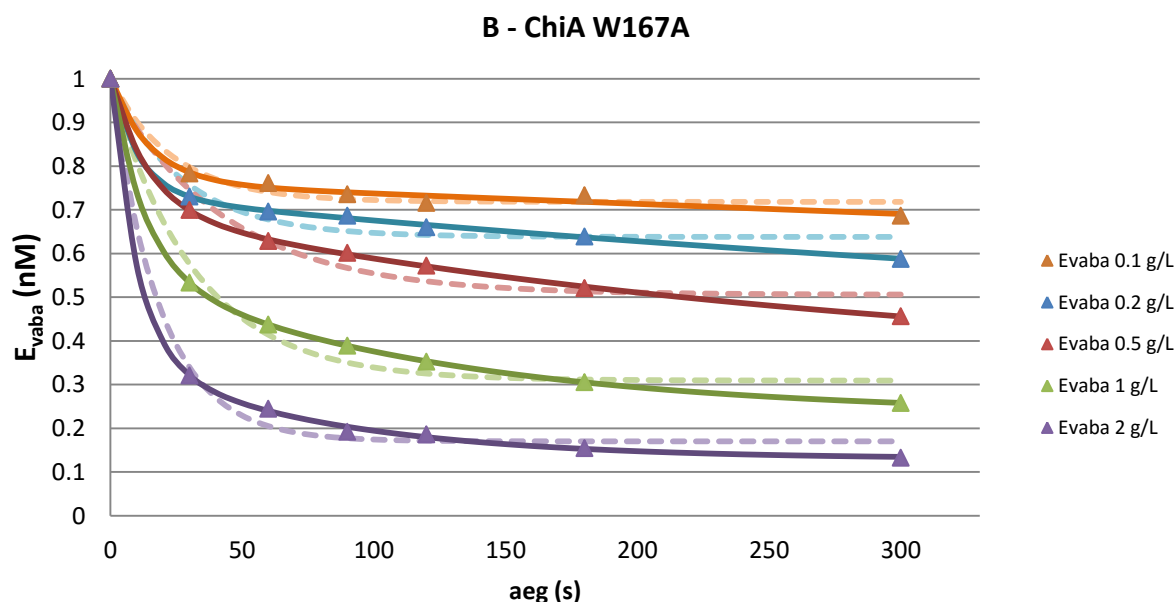
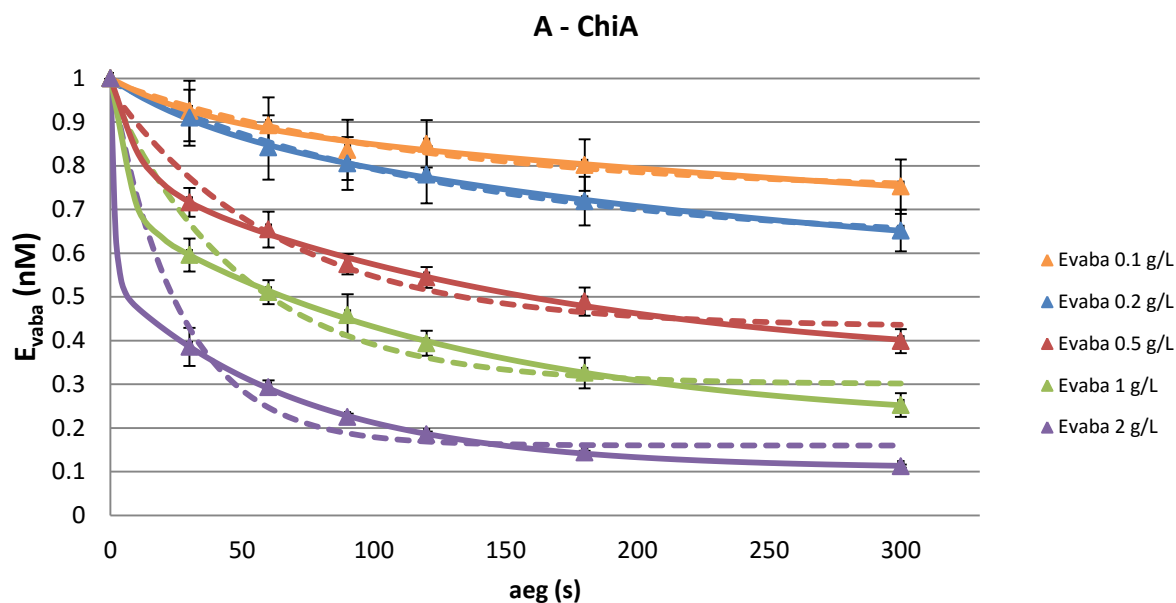
Empiirilised andmed analüüsiti *Statistica StatSoft* programmis vastavalt võrrandile 5 ja 14. Võrrand 14 on võrrand 5 lihtsustatud kujul, eeldusel, et seostumise esimese etapi relaksatsiooniaeg ( $\tau_1$ ) on palju suurem seostumise teise etapi relaksatsiooniajast ( $\tau_2$ ) ning ajast sõltumatu konstantne liige vastab võrrandile 6 (vt. võrrand 14).

Eeldusel, et  $\tau_1 \gg \tau_2$  lihtsustub võrrand 5 kujule (konstantne liige vastab võrrandile 6)

$$[E_{vaba}]_{(t)} = M_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + (E_0 - M_1 - M_2) = M_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + [E_{vaba}]_{St}. \quad (\text{võrrand 14})$$

Analüüs teostati kasutades mitte-lineaarse regressiooni meetodit. Saadud parameetrite abil koostati  $E_{vaba}$  ajasõltuvust kirjeldav joonis (vt. joon. 8), millele on kantud erinevatel substraadi algkontsentratsioonidel vastavad empiirilised  $E_{vaba}$  väärtused ning statilistel analüüsil leitud teoreetilised jooned.

Teoreetilised jooned, pidev ja katkendlik joon, mis vastavad võrranditele 5 ja 14, vastavalt, on saadud *Microsoft Excel*'is, viies statistiliselt analüüsitud parameetrid ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ) nende võrrandite abil manuaalselt ajasõlmestiku punktideks, vahepealsed väärtused on interpoleeritud, saades funktsioonid, mis kirjeldavad võrranditele 5 ja 14 vastavaid teoreetilisi jooni.



**Joonis 8.** Kitinaaside ChiA (A) ja ChiA W167A (B) vaba ensüümi kontsentratsiooni ( $E_{vaba}$ , nM) muutus ajas (sekund).

A: Erinevate  $S_0$  väärtuste juures ChiA vaba ensüümi kontsentratsiooni muutus ajas, katkendlik joon on teoreetiline joon, mis vastavab võrrandile 14 ning pidevjoon on teoreetiline joon, mis vastab võrrandile 5.

B: Erinevate  $S_0$  väärtuste juures ChiA W167A vaba ensüümi kontsentratsiooni muutus ajas, katkendlik joon on teoreetiline joon, mis vastavab võrrandile 14 ning pidevjoon on teoreetiline joon, mis vastab võrrandile 5.

Võrrand 14 ei kirjeldanud katseandmeid nii hästi, kui võrrand 5, ning esines teatud süstemaatiline kõrvalekalle, seda eriti kõrge  $S_0$  juures mõõdetud katseseeriade korral. See näitab, et mõlemat eksponenti, ka väga kiiret, peab arvesse võtma täpse  $E_{vaba}$  ajasõltuvuse määramiseks. Võrrand 5 kirjeldab katseandmeid väga hästi. Samas ei saa nende katsete põhjal öelda, kumb seostumise etapp on kiirem, kas mitteproduktiivse kompleksi ( $E_{MP}S$ ) või produktiivse kompleksi ( $E_P S$ ) moodustumine. Paraku olid kiirema eksponendi relaksatsiooniajad liiga lühikesed võimaldamaks nende täpset katselist määramist. Kuna tehtud katsete põhjal ei olnud võimalik määrata kiirema eksponendi relaksatsiooniaegu, ei saa täita töö eesmärki. Et seda teha, peaks kasutama kiirekineetika masinat.

Võrreldes joonisel 8 välja toodud katsetulemusi ChiA ja ChiA W167A vahel, võib järeldada, et antud mutatsioonil ei ole olulist mõju  $\alpha$ -kitiinile seostumisel. Varasemates töödes on näidatud ChiA W167A aktiivsuse märgatavat vähenemist vees mittelahustuvate polüsahhariidide suhtes ning vastupidist mõju lihtsasti ligipäasetavate substraatide suhtes (nt. Zakariassen jt., 2009). Käesoleva töö raames saadud tulemuste põhjal võib järeldada, et W167A mutatsioon mõjutab kitinolüütilise reaktsiooni teisi etappe – katalüüsi ja dissotsiatsiooniga seotud etappe. See on kooskõlas varasemate tulemustega, kus demonstreeriti ChiA aktiivtsentri -3 seostumiskoha olulisust ensüümi protsessiivsusele ning seostumisenergia gradiendi moodustumisel [Zakariassen jt., 2010, Payne jt., 2013]. Veelgi enam -3 seostumiskoha Trp<sup>167</sup> omab kõrget seostumisenergiat, mis on vajalik energeetiliselt mitesoodsa -1 seostumiskoha ja atsetüüleeritud substraadi vaheliseks seostumisel, seega on tal roll katalüüsi etapis [Norberg jt., 2011]. Kurašin jt., on hiljuti näidanud, et ChiA W167A omab suuremaid  $k_{off}$  väärtusi kui ChiA [Kurašin jt., 2015]. See iseloomustab Trp<sup>167</sup> olulisust kitinolüütilise reaktsiooni dissotsiatsiooni etapis.

## KOKKUVÕTE

Antud töö eesmärk oli kindlaks teha, milline on seostumise kiirust piirav etapp ekso-talitleva ChiA seostumisel tõrksa, vees mittelahustuva, polüsahhariidi ehk kitiiniga. Nendeks etappideks on töös välja pakutud mitteproduktiivse ensüüm-substraat kompleksi moodustumine ehk ensüümi assotsiatsioon subtraadi pinnale ja produktiivse ensüüm-substraat kompleksi moodustumine ehk ensüümi aktiivtsentri ja kitiini ahela komplekseerumine. Viimast iseloomustab redutseeriva otsa seostumine aktiivtsentri +2 produkti-seostumiskohaga.

Seostumiskatsed viidi läbi *S. marcescens* ChiA ja ChiA W167A mutandiga kasutades substraadina  $\alpha$ -kitiini. Seostumiskineetika teoreetiline analüüs reaktsiooniskeemi ja massitoimeseaduse alusel andis vaba ensüümi kontsentratsiooni ( $E_{vaba}$ ) ajasõltuvust kirjeldava seose (võrrandi tuletas Dr. P. Kuusk), mis võimaldas uurida seostumiskineetikaga seotud parameetreid.  $E_{vaba}$  eksperimentaalseks leidmiseks teostati seostumiskatseid erinevatel subtraadi kontsentratsioonidel ja reaktsiooni ajapunktidel. Katseandmete ja MU-NAG<sub>2</sub> kaliibergraafiku alusel arvutati  $E_{vaba}$ . Seostumiskatsete eksperimentaalselt määratud  $E_{vaba}$  ning  $E_{vaba}$  ajasõltuvust kirjeldavatele seostele vastavad seostumiskineetika statistiliste analüüside tulemused on näidatud joonisel 8.

Tulemusena selgus, üks kahest seostumisetapist on väga kiire, mistõttu ei olnud võimalik antud eksperimendisüsteemi kasutades seda määrata. Selleks, et töö eesmärk täita, on vaja teha seostumiskatseid, kasutades kiirekineetika masinat, mis võimaldaks mõõta seostumist lühemate ajavahemike järel.

Mutantse Chia W1677A ensüümiga tehtud katsete põhjal saab öelda, et olulist vahet ChiA W167A mutandi ja ChiA  $\alpha$ -kitiinile seostumise vahel ei ole. Seega Trp<sup>167</sup> ei oma olulist rolli kitinaasi seostumises kitiinile.

## SUMMARY

The chitinolytic model system is the GH18 family *Serratia marcescens* chitinolytic system. It consists of three multimodular chitinases: processive exo-chitinases A (ChiA) and B (ChiB), non-processive endo-chitinase C (ChiC); and a surface-active CBM33-type lytic polysaccharide monooxygenase (CBP21). The hydrolytic reaction of ChiA and recalcitrant polysaccharide is considered as substrate-assisted catalysis. ChiA has two domains: carbohydrate binding domain (CBM) and catalytic domain. The active site of ChiA resides in an architecturally deep cleft like structure. It consists of 6 (-4 to +2) important NAG unit binding sites. The interactions between the enzyme and the substrate are created by aromatic amino acid side chains in the catalytic domain.

In the current study we focused on determining the rate limiting step of substrate binding to *S. marcescens* ChiA. For this, two steps are proposed: the non-productive enzyme-substrate complex formation, where the enzyme has associated with the substrate's surface area, and productive enzyme-substrate complex formation, where the enzyme active site +2 product-binding site is occupied by the reducing end of the chitin chain.

The binding kinetics were theoretically analyzed according to the reaction scheme and the law of mass action, this allowed the free enzyme concentration ( $E_{\text{free}}$ ) time dependent relationship to be determined (equation by Dr. P. Kuusk), which lets us define the parameters of the binding kinetics. The experimental binding of the enzyme was determined by experiments conducted with different substrate concentrations and at different reaction times. After the initial reactions were stopped, further MU-NAG<sub>2</sub> hydrolysis was done and the fluorescence of MU was measured. Using the test results and calibration curve of MU-NAG<sub>2</sub> the  $E_{\text{free}}$  value was calculated. Experimental  $E_{\text{free}}$  values and the  $E_{\text{free}}$  time dependent relationship statistical analysis of binding kinetics are shown in figure 8. Also, the mutated variant of ChiA W167A, which has the -3 binding site aromatic amino acid tryptophan (Trp<sup>167</sup>), in position 167, replaced with alanine, is used as a comparison to the wild type ChiA in this study.

The results show that the binding rate limiting steps can't be distinguished with the test data obtained in this study, due to not being able to calculate the faster exponent relaxation times, thus, the proposed goal wasn't met. However, this can be achieved by using a stopped-flow equipment for this experiment. Also, the test data suggests, that Trp<sup>167</sup> to Ala<sup>167</sup> mutation doesn't noticeably affect the binding to  $\alpha$ -chitin.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Aronson, N. N., Halloran, B. A., Alexyev, M. F., Amable, L., Madura, J. D., Pasupulati, L., Worth, C. and Van Roey, P. (2003). Family 18 chitinase oligosaccharide substrate interaction: subsite preference and anomer selectivity of *Serratia marcescens* chitinase A. *Biochem J* 376: 87-95.
- Beckham, G. T., Ståhlberg, J., Knott, B. C., Himmel, M. E., Crowley, M. F., Sandgren, M., Sørlie, M. and Payne, C. M. (2014). Towards a molecular-level theory of processivity in glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27: 96-106.
- Bhattacharya, D., Nagpure, A. and Gupta, R. K. (2007). Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit. Rev. Biotechnol.* 27: 21-28.
- Brurberg, M. B., Nes, I. F., Eijsink, V. G. H. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 142: 1581-1589.
- Bu, L., Nimlos, M. R., Shirts, M. R., Ståhlberg, J., Himmel, M. E., Crowley, M. F. and Beckham, G. T. (2012). Product binding varies dramatically between processive and nonprocessive cellulase enzymes. *J. Biol. Chem.* 287: 24807-24813.
- Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N. and Zhang, X. (2003). Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials* 24(17): 2871-2880.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. and Chet, I. (1995). Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- Chung, Y. C., Wang, H. L., Chen, Y. M. and Li, S. L. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology* 88(3): 179-184.
- Dahiya, N., Tewari, R. and Hoondal, G.S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 773-82.
- Danişmazoğlu, M., Demir, İ., Sezen, K., Muratoğlu, H. and Nalçacıoğlu, R. (2015). Cloning and expression of chitinase A, B, and C (*chiA*, *chiB*, *chiC*) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. *Turk. J. Biol.* 39: 78-87.
- Davies, G. and Henrissat, B. (1995). Structures and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases. *Structure* 3: 853-859.
- Gökce, C., Sevim, A., Demirbag, Z. and Demir, I. (2010). Isolation, characterization, and pathogenicity of bacteria from *Rhynchites bacchus* (Coleoptera: Rhynchitidae). *Biocont. Sci. Technol.* 20: 973-982.
- Honda, Y., Tanimori, S., Kirihaata, M., Kaneko, S., Tokuyasu, K., Hashimoto, M., Watanabe, T. and Fukamizo, T. (2000). Kinetic analysis of the reaction catalyzed by chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 toward the novel substrates, partially N-deacetylated 4-methylumbelliferyl chitobiosides. *FEBS Lett.* 476: 194-197.

- Horn, S. J., Sørbotten, A., Sikorski, P., Synstad, B., Sørlie, M., Vårum, K. M. and Eijsink, V. G. H. (2005). Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. FEBS J. 273: 491-503.
- Horn, S. J., Sikorski, P., Cederkvist, J. B., Vaaje-Kølstad, G., Sørlie, M., Synstad, B., Vriend, G., Varum, K. M. and Eijsink, V. G. H. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 18089-18094.
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. and Eijsink, V. G. H. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. Biotechnol. Biofuels 5: 45.
- Hult, E. L., Katouno, F., Uchiyama, T., Watanabe, T. and Sugiyama, J. (2005). Molecular directionality in crystalline beta-chitin: hydrolysis by chitinases A and B from *Serratia marcescens*. Biochem. J. 388: 51-856.
- Igarashi, K., Uchihashi, T., Uchiyama, T., Sugimoto, H., Wada, M., Suzuki, K., Sakuda, S., Ando, T., Watanabe, T. and Samejima, M. (2014). Two-way traffic of glycoside hydrolase family 18 processive chitinases on crystalline chitin. Nat. Commun. 5: 3975.
- Knott, B. C., Crowley, M. F., Himmel, M. E., Ståhlberg, J. and Beckham, G. T. (2014). Carbohydrate-protein interactions that drive processive polysaccharide translocation in enzymes 17 revealed from a computational study of cellobiohydrolase processivity. J. Am. Chem. Soc. 136: 8810-8819.
- Kuusk, S., Sørlie, M. and Väljamäe, P. (2015). The predominant molecular state of bound enzyme determines the strength and type of product inhibition in the hydrolysis of recalcitrant polysaccharides by processive enzymes. The Journal of Biological Chemistry 290: 11678-11691.
- Krokeide, I. M., Synstad, B., Gåseidnes, S., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. and Sørlie, M. (2007). Natural substrate assay for chitinases using high-performance liquid chromatography: a comparison with existing assays. Anal. Biochem. 363: 128-134.
- Liu, N., Chen, X. G., Park, H. J., Liu, C. G., Liu, C. S., Meng, X. H. and Yu, L. J. (2006). Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. Carbohydrate Polymers 64(1): 60-65.
- Nawani, N. N. and Kapadnis, B. P. (2001). One-step purification of Chitinase from *Serratia marcescens* NK1, a soil isolate. J. App. Microbiol. 90: 803-808.
- Norberg, A. L., Dybvik, A. I., Zakariassen, H., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Eijsink, V. G. H. and Sørlie, M. (2011). Substrate Positioning in Chitinase A, a Processive Chito-biohydrolase from *Serratia marcescens*. FEBS Lett. 585: 2339-2344.
- Okamoto, Y., Kawakami, K., Miyatake, K., Morimoto, M., Shigemasa, Y. and Minami, S. (2002). Analgesic effects of chitin and chitosan. Carbohydrate Polymers 49(3): 249-252.
- Payne, C. M., Jiang, W., Shirts, M. R., Himmel, M. E., Crowley, M. F. and Beckham, G. T. (2013). Glycoside hydrolase processivity is directly related to oligosaccharide binding free energy. J. Am. Chem. Soc. 135: 18831-18839.



- Perrakis, A., Tews, I., Dauter, Z., Oppenheim, A. B., Chet, I., Wilson, K. S. and Vorgias, C. E. (1994). Crystal-structure of a bacterial chitinase at 2.3-angstrom resolution. *Structure* 2: 1169-1180.
- Qin, C. Q., Du, Y. M. and Xiao, L. (2002). Effect of hydrogen peroxide treatment on the molecular weight and structure of chitosan. *Polymer Degradation and Stability* 76 (2): 211-218.
- Remunan-Lopez, C. and Bodmeier, R. (1997). Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *Journal of Controlled Release* 44(2): 215-225.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31(7): 603-632.
- Sikorski, P., Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. and Várum, K. M. (2006). *Serratia marcescens* chitinases with tunnel-shaped substrate-binding grooves show endo activity and different degrees of processivity during enzymatic hydrolysis of chitosan. *Biochemistry* 45: 9566-9574.
- Sørbotten, A., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. and Várum, K. M. (2005). Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens* – production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. *FEBS J.* 272: 538-549.
- Suzuki, K., Taiyogi, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B. and Watanabe, T. (1999). The third chitinase gene (chiC) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem. J.* 343, 587-596.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N. and Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 1075-1083.
- Synstad, B., Gaseidnes, S., Van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E. and Eijsink, V. G. H. (2004). Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *Eur. J. Biochem.* 271: 253-262.
- Synstad, B., Vaaje-Kolstad, G., Cederkvist, H., Saua, S. F., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H. and Sørli, M. (2008). Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 715-723.
- Tharanathan, R. N. and Kittur, F. S. (2003). Chitin-The undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43: 61-87.
- Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K. S. and Vorgias, C. E. (1996). Bacterial chitinase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay–Sachs disease. *Nat. Struct. Biol.* 3: 638-648.
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., Alagui, A., Vincendon, M., and Vottero, P. (2000). On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer* 41(7): 2463-2469.

- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J. and Watanabe, T. (2001). Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from *Serratia marcescens* 2170. J. Biol. Chem. 276: 41343-41349.
- Vaae-Kolstad, G., Houston, D. R., Riemen, A. H. K., Eijsink, V. G. H. and Van Aalten, D. M. F. (2004). Crystal Structure and Binding Properties of the *Serratia marcescens* Chitin-binding Protein CBP21. J. Biol. Chem. 280: 11313-11319.
- Vaae-Kolstad, G., Horn, S.J., Van Aalten, D. M. F., Synstad, B. and Eijsink, V. G. H. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. J. Biol. Chem. 280: 28492-28497.
- Vaae-Kolstad, G., Westereng, B., Horn, S. J., Liu, Z. L., Zhai, H., Sørli, M. and Eijsink, V. G. H. (2010). An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. Science 330, 219-222.
- Vaae-Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. and Eijsink, V. G. H. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens* – a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. FEBS J. 280: 3028-3049.
- Van Scheltinga, A. C. T., Kalk, K. H., Beintema, J. J. and Dijkstra, B. W. (1994). Crystal-Structures of Hevamine, a Plant Defense Protein with Chitinase and Lysozyme Activity, and Its Complex with an Inhibitor. Structure 2: 1181-1189.
- Van Scheltinga, A. C. T., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B. and Dijkstra, B. W. (1995). Stereochemistry of Chitin Hydrolysis by a Plant Chitinase Lysozyme and X-Ray Structure of a Complex with Allosamidin-Evidence for Substrate Assisted Catalysis. Biochemistry 34: 15619-15623.
- Van Aalten, D. M. F., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. H. and Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-angstrom resolution. Proc. Natnl. Acad. Sci. USA 97: 5842-5847.
- Van Aalten, D. M. F., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M. G. and Eijsink, V. G. H. (2001). Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. Proc. Natnl. Acad. Sci. USA 98: 8979-8984.
- Watanabe, T., Kimura, K., Sumiya, T., Nikaidou, N., Suzuki, K., Suzuki, M., Taiyoji, M., Ferrer, S. and Regue, M. (1997). Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. J. Bacteriol. 179: 7111-7117.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697-703.
- Wu, M. L., Chuang, Y. C., Chen, J. P., Chen, C. S. and Chang, M. C. (2001). Identification and characterization of the three chitinbinding domains with the multidomain chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5100-5106.

Zakariassen, H., Aam, B. B., Horn, S. J., Varum, K. M., Sørli, M. and Eijsink, V. G. H. (2009). Aromatic residues in the catalytic center of chitinase a from *Serratia marcescens* affect processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. J. Biol. Chem. 284: 10610-10617.

Zakariassen, H., Eijsink, V. G. H. and Sørli, M. (2010). Signatures of activation parameters reveal substrate dependent rate determining steps in polysaccharide turnover by a family 18 chitinase. Carbohydr. Polym. 81: 14-20.

## LIHTLITSENTS

Mina, Ragnar Sepp,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

---

<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	kitinaasi	ChiA	kitiinile	seostumise	kineetika
-----------------	-------------------	-----------	------	-----------	------------	-----------

---

mille juhendajad on Silja Kuusk ja Priit Väljamäe,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **24.05.2016**